บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

3.1 การทดลองการเหนี่ยวนำให้ไก่เกิดภาวะ acute phase response (APR)

ไก่ทดลอง

ลูกไก่เนื้อคละเพศอายุ 1 วัน สายพันธุ์ Ross 308 จำนวน 20 ตัว ซื้อมาจากบริษัทเอกชนที่ผลิตลูกไก่เนื้อจำหน่ายในพื้นที่ใกล้เคียง นำมาเลี้ยงที่โรงเรือนสัตว์ปีก ของฟาร์มสาธิต ของคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม โดยไก่จะได้กินอาหารไก่เนื้อและน้ำแบบไม่จำกัด ไก่ทั้ง 20 ตัวจะสุ่มแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ๆ ละ 10 ตัว เป็นกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่เหนี่ยวนำให้เกิดภาวะ APR

การเหนี่ยวนำให้ไก่เกิดภาวะ acute phase response โดยการทำให้ไก่ติดเชื้อ *Eimeria* spp.

เมื่อไก่อายุได้ 14 วัน ไก่ในกลุ่มที่เหนี่ยวนำให้เกิดภาวะ APR จะได้รับ sporulated oocysts ของ *Eimeria* spp. ปริมาณ 10^4 oocysts (ประกอบด้วย *Eimeria acervulina*, *E. maxima*, และ *E. tenella*) โดยการป้อนปาก ส่วนไก่ในกลุ่มควบคุมเป็นไก่สภาวะปรกติ ทำการเจาะเลือดที่ตำแหน่งปีกเพื่อเก็บซีรัมในไก่ทุกตัวทั้ง 2 กลุ่ม เมื่อวันที่ป้อนเชื้อ ตอนอายุ14 วัน และวันที่ 7 หลังจากการป้อนเชื้อ อายุ 21 วัน เลือดที่ได้นำมาปั่นแยกซีรัม แล้วเก็บรักษาไว้ที่ อุณหภูมิ -20 °C จนกว่าจะนำมาตรวจ

3.2 การตรวจวัดความเข้มข้นของ Total serum proteins (TSP) ในตัวอย่างซีรัม

การวัดปริมาณ TSP ในตัวอย่างซีรัมของไก่ได้ใช้วิธีการ bicinchoninic acid (BCA) protein assay โดยใช้ชุดตรวจสำเร็จรูป BCA Protein Assay Kit (Pierce Chemical Company) ในการตรวจแต่ละครั้งได้ใช้ bovine serum albumin (BSA) เป็นโปรตีนมาตรฐานสำหรับเทียบความเข้มข้นของตัวอย่างซีรัม

3.3 การตรวจวัดระดับ serum transferrin (Trf) ในตัวอย่างซีรัม

การบ่งชี้โปรตีน Trf ในตัวอย่างซีรัมได้ใช้วิธีพัฒนามาจากวิธีการของ Chamanza (Chamanza et al., 1999) โดยมีขั้นตอนเบื้องต้นดังนี้ นำตัวอย่างซีรัม เจือจาง 1:25 ด้วย non-reducing sample loading buffer แล้วนำไปแยกแถบของโปรตีนด้วยวิธี Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) เสร็จแล้วทำการย้ายแถบโปรตีนจากเจลลงบนแผ่น Hybond membrane (Amersham, Bioscience) ด้วยเครื่อง semi-dry electrophoresis transfer cell (Bio-rad) เสร็จแล้วทำ

การบ่งชี้ตำแหน่งโปรตีน Trf บนแผ่น membrane ด้วยวิธี immunostaining โดยใช้ rabbit anti-chicken Trf (Inter-cell Technologies, NJ) ปริมาณเจือจาง 1:2000 เป็น primary antibodies ร่วมกับ ชุดตรวจ Western blotting ECL-kit (Amersham, Bioscience) ปริมาณความเข้มข้นของ Trf ในตัวอย่างซีรัม ได้มาจากการวัดความเข้มข้นของ แถบโปรตีน Trf ภายหลังจากที่ทำการแยกโปรตีนในตัวอย่างซีรัมผ่าน 15% SDS PAGE ภายใต้ภาวะ non-reducing condition และนำเจลมาย้อมด้วยสีด้วย Coomassie brilliant blue อบให้ gel แห้งแล้วนำมาวัดความเข้มข้นของโปรตีนด้วยเครื่อง Geldoc imaging densitometer (Bio-rad) โดยใช้โปรตีน Trf (Conalbumin, Sigma) ที่ทราบความเข้มข้นเป็น ค่ามาตรฐานทั้งตำแหน่งและความเข้มข้นในแผ่นเจล

3.4 การตรวจวัดระดับ serum albumin (Alb) ในตัวอย่างซีรัม

การบ่งชี้โปรตีน Alb ในตัวอย่างซีรัมมีขั้นตอนเบื้องต้นดังนี้ นำตัวอย่างซีรัม เจือจาง 1:25 ด้วย non-reducing sample loading buffer แล้วนำไปแยกแถบของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE เสร็จแล้วทำการย้ายโปรตีนจากเจลลงบนแผ่น Hybond membrane (Amersham, Bioscience) ด้วยเครื่อง semi-dry electrophoresis transfer cell (Bio-rad) เสร็จแล้วทำการบ่งชี้ตำแหน่งโปรตีน Alb บนแผ่น membrane ด้วยวิธี immunostaining โดยใช้ rabbit anti-chicken serum albumin antibodies (Nordic Immunological Laboratories, Tilburg) ร่วมกับชุดตรวจ Western blotting ECL-kit (Amersham, Bioscience) ปริมาณความเข้มข้นของ Alb ในตัวอย่างซีรัม ได้มาจากการวัดความเข้มข้นของ Alb band ภายหลังจากที่ทำการแยกโปรตีนในตัวอย่างซีรัมด้วยวิธี cellulose acetate gel electrophoresis

3.5 การตรวจ SAA ในตัวอย่างซีรัม

3.5.1 การผลิต โปรตีน recombinant chicken SAA (rchSAA)

นำเวคเตอร์ pGEX [glutathione S-transferase (GST) fusion protein expression vector, Amersham Pharmacia Biotech] ตัดต่อด้วย cDNA ของ SAA ที่สกัดได้มาจาก fibroblast-like synoviocytes ได้เป็น เวคเตอร์ pGEX-chSAA ที่สามารถนำมาผลิต rchSAA ดังที่ได้มีการกล่าวไว้ในงานวิจัยก่อนหน้านี้ (Upragarin et al., 2005) วิธีการผลิต rchSAA มีขั้นตอนดังต่อไปนี้ นำเวคเตอร์ pGEX-chSAA ไปใส่ในเซลล์ของ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) แล้วนำไปเลี้ยงเพิ่มจำนวนเชื้อนาน 16 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 °C แล้วนำไปใส่ใน Luria-Bertani broth containing 100 µg/ml ampicillin (Boehringer Mannheim, East Sussex, UK) ปริมาณ 1:100 แล้วนำไปเลี้ยงเพิ่มจำนวนเชื้อนาน 3 ชั่วโมง (ได้เชื้อมีความเข้มข้นค่า OD_{600} เท่ากับ 1.0) แล้วเติม 0.1 mM isopropyl β-D-thiogalactosidase (IPTG: Sigma, Dorset, UK) เพื่อให้เชื้อสร้าง rchSAA แล้วนำ broth ไปบ่มต่อนาน 5 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 37 °C หลังจากนั้น นำ broth มาปั่นแยกเชื้อที่ 3000 × g นาน 15 นาที ที่ 4 °C นำตะกอนของแบคทีเรียมาละลายด้วย PBS (140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4, 1.8 mM KH_2PO_4, pH 7.3) ที่มี 0.2 mg/ml lysozyme (Sigma) และ 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride

(PMSF) (Sigma) แล้วนำสารละลายตะกอนแบคทีเรียไปทำให้เซลล์แตกด้วยคลื่นเสียง จำนวน 6 ครั้ง ๆ ละ 30 วินาที เสร็จแล้วนำไปเติม Triton X-100 ในอัตราส่วน 1% แล้วนำสารละลายไปผสมให้เข้ากันอย่างช้า ๆ ที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำสารละลาย ไปปั่นที่ 20,000 × g นาน 10 นาที ที่ 4 °C และนำไปกรองผ่านตัวกรองขนาดรู 0.45 μM (Millipore) เพื่อแยกตะกอนออก

ทำการแยกโปรตีน GST-rchSAA ด้วย วิธี affinity chromatography โดย ผสม สารละลายที่ผ่านการกรอง ใน สารละลาย เม็ด bead 50% glutathione Sepharose 4 B (Pharmacia) นาน 24 ชั่วโมง ที่ 4 °C เพื่อให้ GST-rchSAA fusion protein เกาะจับกับเม็ด bead เสร็จแล้วทำการแยกเม็ด bead ที่มี GST-rchSAA เกาะจับออก โดยนำสารละลายไปปั่นตกที่ 500 × g นาน 5 นาที ทำการแยกตะกอนเม็ด bead แล้วล้างด้วย PBS (pH 7.3) ปริมาณ 10 เท่า ของปริมาตรของเม็ด bead จำนวน 5 ครั้ง เพื่อล้างโปรตีนของ *E. coli* ออกให้มากที่สุด ทำการตัดแยกโปรตีน rchSAA ออกจาก GST ที่ติดอยู่บนเม็ด bead โดยการเติม bovine thrombin (Sigma) (5 U/mg protein bound) ใน PBS (pH 7.3) และตั้งหลอดทดลองไว้ที่อุณหภูมิ 26 4 °C นาน 16 ชั่วโมง นำสารละลายที่มี rchSAA ภายหลังจากการตัดย่อยแยกด้วย thrombin แล้ว นำไปปั่นตก แล้วนำไปไหลผ่านคอลัมน์ benzamidine sepharose column (Pharmacia) เพื่อแยก thrombin ออก ทำการตรวจสอบ สารละลาย rchSAA ที่ผ่านคอลัมน์ ด้วย 15% 6 M urea PAGE และทำimmunoblotting โดยใช้ rabbit anti chicken AA antiserum (Upragarin et al., 2005) และ peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG (Sigma) เป็น secondary antibody. ในขั้นตอนสุดท้ายนำสารละลาย rchSAA มาทำให้บริสุทธิ์ โดยทำการแยกสารผ่านเยื่อ (dialysis) ด้วยน้ำบริสุทธิ์ และเก็บสารละลาย rchSAA ไว้ที่ -20 °C เพื่อใช้ต่อไป

3.5.2 การผลิต **rabbit antiserum** ต่อ **rchSAA**

นำ purified rchSAA ที่ผลิตได้มาใช้ในการผลิต แอนติบอดีในกระต่าย โดยใช้ 2 mg ของ rchSAA ไป แยกด้วย 15% SDS PAGE แล้ว ย้อมเจลเพื่อให้เห็นแถบโปรตีน rchSAA ด้วย Coomassie brilliant blue staining (R250 Biorad) แล้วทำการตัดที่ตำแหน่ง rchSAA ออกไปใช้ นำแถบเจลที่มี rchSAA มาบดแล้ว ผสมกับ adjuvant คือ dl-α-tocopheryl acetate (Diluvac Forte, Intervet) แล้วนำไปฉีดเข้ากล้ามเนื้อสะโพกของกระต่าย ทำการฉีดกระตุ้นซ้ำด้วย rchSAA ปริมาณ 2 mg ที่อยู่ในแถบเจลผสมร่วมกับตัวเสริม เมื่อ 2สัปดาห์ภายหลังจากการฉีดครั้งแรก 4 สัปดาห์หลังจากนั้นทำการเจาะตรวจเลือด นำมาตรวจสอบ antiserum ที่ได้ด้วย 15% SDS-6 M urea-PAGE-gel ร่วมกับ Western blotting โดยใช้ซีรัมไก่ที่อยู่ในระยะ acute phase response และ purified rchSAA

3.6 การตรวจระดับ apolipoprotein A-I (ApoA-I) ในตัวอย่างซีรัม

ในการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า antiserum ที่เตรียมมาจาก AA fibrils ให้จะเกาะจับต่อแถบโปรตีน SAA และ AA fibrils และ โปรตีน ApoA-I จึงได้นำ antiserum ที่ได้มานี้ นำมาบ่งชี้แถบโปรตีน ApoA-I ในการศึกษาเบื้องต้น

ส่วนการผลิต antiserum ที่จำเพาะต่อ ApoA-I นั้นดำเนินการโดยนำตัวอย่างซีรัมมาแยกโปรตีน ApoA-I ด้วย 15% SDS PAGE under reducing conditions แล้วทำการตัดแถบเจล ณ ตำแหน่งโปรตีน ApoA-I แล้วนำไปฉีดเข้ากระต่ายโดยมีวิธีการเช่นเดียวกันกับการเตรียม antiserum ต่อ rchSAA ดังที่กล่าวไว้ข้างต้น

3.7 การคำนวณค่าดัชนีของการอักเสบ (acute phase index, API)

ค่าดัชนีของการอักเสบนั้น ได้กำหนดขึ้นเองโดยอาศัยหลักการนำค่า positive APPs เป็นตัวตั้งหารด้วย negative APPs และคูณด้วยค่าคงที่สัมพัทธ์คือ ค่า TSP ที่ควรจะคงที่ในกระแสเลือดไม่ว่าร่างกายจะมีสภาวะใด ๆ ซึ่งค่า API คำนวณได้จากสูตรดังนี้

$$API = \frac{Trf\ (mg/ml) \times TSP\ (mg/ml)}{Alb\ (mg/ml)}$$

3.8 การวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลความเข้มข้นของค่า APPs ที่ได้จากการศึกษาโดยการเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบ และระหว่างกลุ่มทดสอบที่แตกต่างกัน นำมาทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี One-way ANOVA และ วิเคราะห์แต่ละกลุ่มที่จุดเวลาต่าง ๆ ด้วย *Student's t test* การวิเคราะห์ค่าทางสถิติที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความมั่นใจ 95 % ($P < 0.05$) โดยใช้โปรแกรมทางสถิติ SPSS 12.0.1 for Windows (SPSS Chicago, IL)